

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

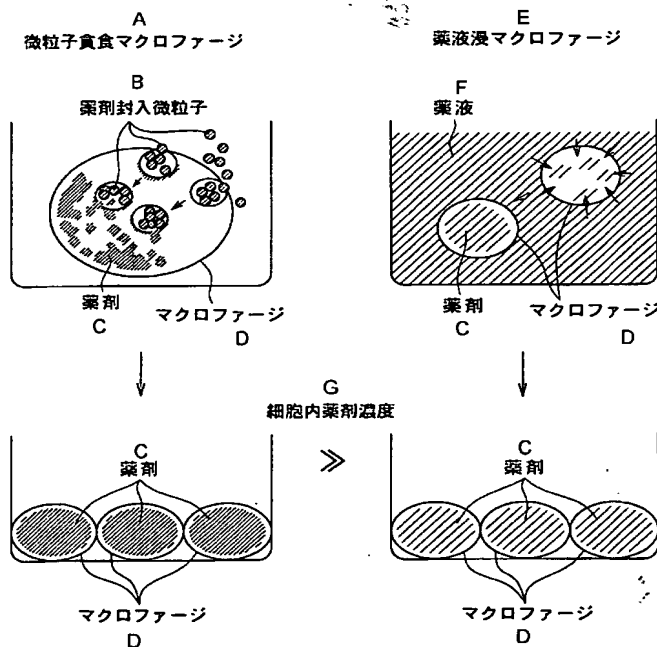
(10) 国際公開番号  
WO 2004/019982 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34, A61P 1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02, 35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D 498/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010871
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 27 日 (27.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-247871 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 寺田 弘 (TERADA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都 文京区千駄木 三丁目 3 7 番 1 7-9 0 1 号 Tokyo (JP).
- (73) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 牧野 公子 (MAKINO, Kimiko) [JP/JP]; 〒239-0814 神奈川県 横須賀市二葉一丁目 4 0 番 1 4 号 Kanagawa (JP). 杉源 一郎 (SOMA, Gen-Ichiro) [JP/JP]; 〒158-0084 東京都 世田谷区東玉川一丁目 1 0 番 2 1 号 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 中村 和男 (NAKAMURA, Kazuo); 〒144-0051 東京都 大田区西蒲田 七丁目 6 0 番 2 号 鈴木ビル 2 0 1 号 中村国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[続葉有]

(54) Title: REMEDY

(54) 発明の名称: 治療薬



- A...MICROPARTICLE-PHAGOCYTOSING MACROPHAGE  
B...MICROPARTICLE HAVING DRUG ENCAPSULATED THEREIN  
C...DRUG  
D...MACROPHAGE  
E...MACROPHAGE SOAKED IN LIQUID DRUG  
F...LIQUID DRUG  
G...DRUG CONCENTRATION IN CELL

(57) Abstract: It is intended to provide a remedy for diseases caused by macrophages with dysfunction or mediated by macrophages. Namely, a remedy which activates the phagocytic capacity of macrophages and thus is efficiently incorporated into the macrophages due to the vigorous phagocytosis. As a result, the macrophages with dysfunction are normalized, macrophages infected with a pathogen are exterminated or a pathogen in the infected macrophages is exterminated.

(57) 要約: 機能異常のマクロファージ、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病に対する治療薬を提供するためのものであり、マクロファージの食食機能を活性化しこれを利用して、マクロファージに積極的に食食されることでマクロファージに効率的に取り込ませ、これにより、機能異常となったマクロファージを正常化する、病原体感染マクロファージを殺滅する、又は、病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅する治療薬。



SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 治療薬

## 5 技術分野

本発明は、マクロファージの貪食能を利用し、機能異常マクロファージの正常化を図る、又は種々の感染性病原体に有効な治療薬に関するものである。本発明にかかる治療薬（薬物又は製剤）は、治療上及び／又は診断上の目的で与えられるあらゆる物質及びこれらの集合体を対象とし、その製剤は、薬物（場合によっては、薬物担体を含む）と薬物担体の合剤である。

## 背景技術

## I. マクロファージ

15 まず、本発明にかかる治療薬の作用において中核的機能を担うマクロファージについて概説する。

マクロファージの形態・機能については、例えば高橋 潔 等著「生命を支えるマクロファージ」、文光堂、2001年に詳述されているが、本発明に関連する背景を述べれば以下の通りである。マクロファージとは単核食細胞系（MPS：Mononuclear Phagocyte System）を構成する細胞である。血中の単球は骨髓細胞中の造血幹細胞に由来し、骨髓中で分裂分化して血中に流出し、種々の組織に定着して種々の名称で呼ばれる単球細胞へと分化する。この細胞は結合組織中では組織球、肝臓ではクッパー細胞、肺では肺泡マクロファージ、リンパ節／脾臓ではマクロファージ、25 体腔では胸腔／腹腔マクロファージ、骨では破骨細胞、皮膚ではランゲルハンス細胞、神経組織では小膠細胞、脳ではマイクログリア、滑膜ではA型細胞と呼ばれ、組織特異的な性質を有する。

## 1. 一般的性状

(1). 直径約15～20ミクロンの単核細胞で、細胞質に富み、ガラスやプラスチック表面に粘着し易い。偽足を出して運動し、強い異物貪食作用を持つ。

5 (2). 生体防御担当細胞。

(3). 異物排除機能と免疫能を持つ。

(4). 抗原情報をTリンパ球に提示して免疫を成立させる。

(5). インターフェロンによって活性化され、細胞性免疫のエフェクターとなる。

10 (6). リンパ球に比較してX線抵抗性である。

## 2. マクロファージの生理的意義

### (1). 貪食機能

マクロファージの機能として最もよく知られているものは、貪食作用  
15 である。この機能は生命が誕生し、これが進化するにあたって単細胞の  
時代から備わっていた最も基本的な機能のひとつと考えてよい。従って、  
マクロファージの特徴のひとつは、その存在が種横断的に普遍性を持つ  
ことである。この特徴は、マクロファージ機能を対象とする研究の大きな  
利点のひとつを提供していると思われる。つまり、仮に哺乳動物の疾  
20 病を対象とした治療薬の開発研究を行う場合であっても、哺乳動物以外  
のマクロファージが機能的にも研究素材としても有用であり得ること  
である。この点は、マクロファージが、系統発生的に保存された細胞であ  
る点による。

### (2). 生体防御機能

25 マクロファージの機能として次に重要なのは、生体防御作用である。  
この作用は非特異的生体防御作用と呼ばれるものであるが、近年の研究  
からマクロファージの生体防御作用にも特異性があることが明らかにな  
りつつある。もともと非特異的という言葉は、T細胞に特徴づけられる

抗原特異性や免疫記憶に対応した言葉であり、現在のところ厳密な意味での抗原特異性や免疫記憶がマクロファージに存在することは証明されていないから、マクロファージの生体防御作用が非特異的であるということは間違いではない。しかし、例えば病原体の種類に応じて、マクロ  
5 ファージの応答は質的に異なること、そして、この質的に異なる応答の一部は、マクロファージ細胞表面の病原体を認識する受容体の違いと対応することが示す様に、異物（又は環境）の刺激に対する細胞応答の側からみれば、マクロファージの作用は特異的であるといえる。

現在では、上記の点も踏まえ、マクロファージを中心とする生体防御  
10 作用を自然免疫機構（The innate immune system）、T細胞を中心とする生体防御作用を獲得免疫機構（The acquired immune system）と捉えるのが一般的になりつつある。さらに、マクロファージの系統発生的普遍性を考えれば、当然であるが、自然免疫機構もまた、系統発生的に高く保存された生体防御機構である。

### 15 （３）．自然免疫機構

マクロファージを中心とする自然免疫機構は、獲得免疫機構を持たない生物種にあっては勿論のこと、獲得免疫機構を備えた生物種にあって  
も、異物識別、排除機構という生体防御機構の中核を担っている。獲得免疫機構を備えた生物でさえも病原体などの異物の識別・排除は殆ど  
20 の場合自然免疫機構の機能でまかなわれているが、これが不十分な場合には、獲得免疫機構が動員される。この場合でも、特異的異物識別にはマクロファージ等による抗原提示が必須になるし、外来異物の排除に際して、排除機構の中心を担うのもまたマクロファージ等、自然免疫機構を構成する細胞である。

### 25 （４）．異物排除

一方、内因性の異物（例えば、ウイルス感染細胞の除去）などは、獲得免疫に特徴的な細胞傷害性T細胞によって排除されるが、この細胞傷害性T細胞の増殖と成熟との両方に、マクロファージ等による抗原提示

を受けた別のT細胞が必須である。すなわち、獲得免疫が、十分な機能を果たすためには、自然免疫機構が完全かつ合目的に機能することが前提となる。

(5) . 機能不全

- 5 従って、マクロファージの貪食や抗原提示等の機能不全は、一義的に、免疫不全の潜在的な原因となりうることになる。具体的に言えば、先にI.1 (マクロファージの一般的性状) で述べた諸点に関連する機能不全と疾患として以下に記すものが知られている。すなわち、
- 10 1). 異物貪食作用の異常としての貪食機能異常症としては白血球接着欠損症、チェディアック・ヒガシ症候群などが知られている。いずれの場合にも、貪食機能に異常が認められており後者では、ライソソーム酵素の貪食空腔への輸送に異常があるために、殺菌能が低下し、貪食能は顕著に亢進している。
- 15 2). 生体防御担当機能の異常としての疾患としては、慢性粘膜皮膚カンジダ症があげられる。この疾患に罹患した患者のマクロファージは、遊走能が低下しカンジダの殺菌能も低下している。
- 3). 異物排除機能と免疫能の異常としての疾患としては、ウィスコット・アルドリッチ症候群をあげることができる。患者マクロファージは、遊走異常、抗体依存性細胞傷害作用の欠陥など複雑な免疫異常を呈する。
- 20 4). 抗原情報の提示機能異常としては、T細胞、B細胞は健常にも拘わらず重症の免疫不全を引き起こす主要組織適合(MHC) クラスII抗原欠損症が知られる。
- 5). インターフェロンによって活性化され、細胞性免疫のエフェクターとなる点についての機能異常としては、インターフェロン受容体が欠損した幼児は、結核菌感染を防御できず結核菌感染が致死性的となるインターフェロン受容体欠損症が知られる。
- 25

さらに、獲得免疫細胞を欠損した哺乳動物は存在しかつ生存し得るが、

マクロファージ欠損動物は存在し得ない。そして、異物識別・排除を中心とする生体防御機構には、細胞間での情報伝達を行うサイトカインと総称される生理活性物質が重要な機能を果たすことも明らかになりつつある。マクロファージが産生分泌するサイトカインの種類は極めて多様性

5 性に富む。この様に、マクロファージの機能は、異物の識別・排除についてみても個体の恒常性維持に必須である。

#### (6) . 解剖学的特徴

マクロファージの解剖学的特徴は、種々の組織に定着した固有の性格をもつ組織特異的マクロファージによって異なっている。このことは、

10 個体と環境との接点である粘膜組織でみても明らかである、呼吸器、消化器、泌尿生殖器の粘膜下層には、それぞれ特異的なマクロファージが常在している。これら組織特異的マクロファージは、組織特異的な内外の環境との生体応答を行っている。このことは、マクロファージが異物の識別・排除を超えて生体恒常性の維持に重要な機能を果たしているこ

15 とを示唆する。組織特異的マクロファージの生理的意義は、未知の点が多い。翻って、新たな視点から、組織特異的マクロファージの存在意義を見ると、まさに種々の病態との関係でこそ、注目されてよい。

#### (7) . 病態との関係

何故ならば、マクロファージが免疫機構の中核に位置するとの生理的意義を踏まえれば、組織特異的マクロファージの機能異常は組織特異的な病態の誘導に関わることが強く示唆されるからである。事実、炎症性腸疾病のひとつであるクローン病において、さらにはリウマチなどの自己免疫疾患、骨粗鬆症などの加齢性疾患など難治性疾患の多くは、マクロファージの機能異常を何らかの形で伴っている。結核菌などの抗酸

20 菌の慢性感染も又、抗酸菌自体の問題とは別に、肺胞マクロファージの機能異常が、病態の背景にあると考えてもよからう。この様に考えれば、標的細胞としてのマクロファージの貪食能を増大させ、その結果マクロファージ内の治療薬の濃度を増大させるような治療薬の開発は、現在、

25

有効な治療法がない結核等感染症を含む難治性疾患の新規治療法を提供する上で、極めて重要かつ合理性のある対象であると言える。

## II. マクロファージの機能異常と疾患

### (1) . 感染性病原体媒体としてのマクロファージ

5      WHOによると結核、エイズ、マラリアなどは世界的な規模で最も重視しないとイケない慢性難治性感染症である。例えば、毎年800万人以上の結核患者が発生し、300万人が死亡しているという。これらの疾病に有効な治療薬（薬物／製剤）を開発することは緊急課題であり、その社会的意義は極めて大きい。

10      ところで、病原体の感染の防御・除去に関し、生体内で最も重要な機能を担う細胞のひとつが、マクロファージである。実際、マクロファージは、生体内臓器、器官のあらゆる場所に分布している。これらマクロファージは存在する臓器、器官によって、形態も機能も異なっているが、病原体の感染の防御・除去を果たすという点では、共通である。

15      一方、感染性病原体は、進化の過程で、マクロファージの攻撃を回避する様々な手段を獲得している。さらに、感染性病原体の中には、マクロファージに潜伏し、マクロファージを宿主するものが多い。この様にしてマクロファージに寄生することに成功した病原体は、慢性的かつ反復的に感染症を引き起こす原因となることは言うまでもなく、致命的な  
20      結果を招くことも稀ではない。すなわち、この場合には、本来病原体の感染の防御・除去を達成すべきマクロファージが、一転して感染性病原体媒体として機能することになる。

### (2) . マクロファージ内の病原体

25      その典型例を結核に見ることができる。すなわち、病原体（マイコバクテリウム ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、又はマイコバクテリウム ボvis (*Mycobacterium bovis*)) は初期感染経路である肺胞のマクロファージによって貪食されるが、その際形成される食胞（ファゴゾーム）内において安定に存在している。つまり、病



原体は本来ならばこれらを消化すべきマクロファージを「シェルター」として生存し得る。この他にもライの原因菌であるマイコバクテリウムレプラ (*Mycobacterium leprae*)、非定型抗酸菌症の原因菌であるマイコバクテリウム アビウム (*Mycobacterium avium*) や、クラミジア症

5 の原因菌であるクラミジア ニューモニア (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*)、又はクラミジア シッタシ (*Chlamydia psittaci*) など、根治療法が未だに確立されておらず、漫延が危惧される難治性感染疾患の多くの原因菌もまた、マクロファージが感染病原体媒体となることに共通性が見出される。

10 結核菌、エイズウイルス等は、現在、予防に多大な精力が傾けられている。しかし、いったん感染が成立してしまえば、有効な治療法は存在しない。仮に、感染病原体に対して直接的に殺菌作用をもつ化合物が存在したとしても、一般に、該当する治療薬を単に投与することで、特定の病原体を殺滅（本発明における殺滅は病原体の全てもしくは一部を殺

15 して消滅させることを意味する。）するに十分な濃度を病原体保持マクロファージ内で達成することは容易ではない。

#### 発明の開示

従って、有効な治療薬を投与することで、細胞外の病原体は殺滅でき

20 ても、病原体媒体としてのマクロファージは依然として病原体供給源として生存し、病原体を供給し続けることになる。現在マクロファージ内に寄生する病原体に対しての根治療法が皆無である理由は、如上の点に求めることができる。本発明はこの点を課題とするものであり、逆に、病原体媒体としての病原体感染マクロファージを殺滅する、又は病原体

25 感染マクロファージ内の病原体を殺滅することができれば、上述した多くの慢性難治性感染症を根本的に治療することができることになる。このため、マクロファージの機能異常に基づき、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病に対する治療薬を提供することが本発明の目的で

ある。

本発明者らは、鋭意研究を進めた結果、病原体媒体としての病原体感染マクロファージを殺滅すること、病原体感染マクロファージ内の病原体を殺滅すること、又は、疾病のために機能が異常となったマクロファージに作用することを目的とした、全く新しい着想を得るに到り本発明を完成したものである。

本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、マクロファージ内の病原体を殺滅することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする。

また、本発明の治療薬は、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症又はトキソプラズマ症のいずれかに対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが病原体を保持することによる疾患を有効に治療することができる。

また、本発明の治療薬は、クローン病、リウマチ、がん又は免疫不全症候群に対するものであることが望ましい。これにより、マクロファージが機能異常の状態にあることによる疾患を有効に治療することができる。エイズは免疫不全症候群に含まれる。

また、前記マクロファージは、粘膜組織に常在するものであることが望ましい。これにより、呼吸器、消化器あるいは生殖器など、病原体が初感染を起こす部位で疾患を有効に治療することができる。

また、前記マクロファージは、腹腔、大網、乳斑、肺胞、肺間質、肝臓、門脈域、脾臓、骨髄、胸腺、消化管、口腔偏頭、副腎、脳下垂体、甲状腺間質、ランゲルハンス島、副甲状腺、松果体、精巢、卵巣、卵管、子宮、胎盤、皮膚、髄膜、脳質、脈絡叢のいずれかに常在するもの、又は、前記マクロファージは、マイクログリア、マイクログリアの前駆細胞

胞、グリア細胞、グリア細胞の前駆細胞、前記常在マクロファージの前駆細胞、常在マクロファージ類縁細胞、若しくは常在マクロファージ類縁細胞の前駆細胞であることが望ましい。これにより、体内の種々の臓器あるいは組織に起こる疾患を有効に治療することができる。

- 5      また、本発明の治療薬は、P L G A（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核に対するものであることを特徴とする。

また、さらに、リファンピシンを含むことが望ましい。これにより、結核菌を殺滅する治療薬を提供できる。

- 10      また、分子量1,500から150,000のP L G Aを含むことが望ましい。これにより、マクロファージに貪食されかつ生分解性の微粒子製剤を提供できる。

また、分子量1,500から75,000のP L G Aを含むことが望ましい。これにより、マクロファージに貪食されかつマクロファージ内で薬物を放出しやすい微粒子製剤を提供できる。

- 15      また、さらにP V A（ポリビニルアルコール）、P E G（ポリエチレングリコール）、P E O（ポリエチレンオキシド）、糖、タンパク質、ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含むことが望ましい。これにより、マクロファージの種類に応じて活発に貪食される微粒子製剤を提供できる。

- 20      また、さらに、P V A、P E G、P E O、糖、タンパク質、ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含み、主たる粒子直径が1～6ミクロンである微粒子製剤であることが望ましい。これにより、マクロファージの貪食機能を有効に利用してマクロファージ内に有効に取り込ませることができる。

25

本明細書は本願の優先権の基礎である特願2002-247871の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明と従来の治療薬のマクロファージ内薬剤濃度を対比して説明する図である。

図 2 は、本発明の実施の形態の微粒子製剤の粒子径分布を示す図である。

図 3 は、リファンピシンの本発明による投与と従来用いられている溶液による投与によって NR8383 細胞に取り込まれる量がどの程度異なるかを対比して説明する図である。

図 4 は、RFP-PLGA 微粒子のリファンピシン保持能力が PLGA 微粒子の組成によって放出するリファンピシン量が異なることを説明する図（その 1）である。実験値は誤差 5 % を含む。

図 5 は、RFP-PLGA 微粒子のリファンピシン保持能力が PLGA 微粒子の組成によって放出するリファンピシン量が異なることを説明する図（その 2）である。実験値は誤差 5 % を含む。

図 6 は、結核菌を貪食したマクロファージが RFP-PLGA 微粒子を貪食することでマクロファージ内の結核菌を殺滅することが可能なことを説明する図である。生存率は、1 : 5 % 以下、2 : 5 ~ 25 %、3 : 25 ~ 50 %、4 : 50 ~ 75 %、5 : 75 % 以上で評価した。なお、投与したリファンピシンは単独投与（図中 R F P で表示）では  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、RFP-PLGA による投与（図中 RFP-PLGA で表示）では  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ （推定値）である。

図 7 は、リポ多糖を用いて肺胞マクロファージ NR8383 の貪食能を活性化することにより、佐藤肺癌細胞との共培養により機能異常の状態にある NR8383 の佐藤肺癌細胞に及ぼす細胞毒性効果が増強することを説明する図である。（□）はリポ多糖未処理の NR8383 の佐藤肺癌に対する細胞傷害効果を、（■）はリポ多糖（ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）処理した NR8383 の佐藤肺癌細胞に対する細胞傷害性効果をそれぞれ示している（共培養 4 時間）。なお、細胞傷害効果（%）は、培養液中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ量から算出し、評価した。

発明を実施するための最良の形態

以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。ただし、本発明はこれら実施の形態によりその技術的範

5 囲が限定されるものではない。

マクロファージ全般に備わっており、しかもマクロファージに特異的な機能のひとつに貪食作用があげられている。貪食作用は、大きさが約1ミクロン程度以上の固形物を積極的にマクロファージ細胞内に取り込む機能である。

10 ところで、人工的に作製した固形物を積極的に貪食させるならばマクロファージ内に通常は達成できない濃度で固形物を蓄積させることが可能である。このような固形物は一般に粒子として提供し得るが積極的に貪食させるためには、貪食に有利な粒子径、粒子の表面特性（電荷を有すること、一定の柔軟構造を有することなど）などを最適化する必要がある。例えば、ポリラクテートとポリエチレングリコールを混合した材料を基材としてマクロファージに貪食されやすい粒子を調製することが可能である。

そこで、感染病原体又は病原体感染マクロファージに作用する薬物を混和して、粒子を調製するならば、粒子の貪食に伴い薬物もまたマクロ  
20 ファージ内に積極的に取り込まれることになる。

本発明の根幹は、マクロファージがもつ貪食機能を積極的に活用して、マクロファージの機能異常にかかる疾病（I. 2. (5)、(7)、II. (1)、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症、トキソプラズマ症又はがんなど）を治療する点にある。そこで、これらに有効な薬物をマクロファ  
25 ージが貪食しうる微粒子（薬物担体）中に含有させた製剤を調製することで上記目的を達成しようとするものである。

通常、薬物担体と薬物との合剤である製剤は、むしろマクロファージによる貪食を回避するための設計が必要である。しかし本発明は、従来

とは全く逆転した発想に基づいて、マクロファージの貪食活性を積極的に利用する点に新規性がある。

前述の通りマクロファージの生体防御機能の一つに貪食作用が有る。貪食作用はマクロファージに特徴的に認められる固有の機能であり、マ  
5 クロファージ以外の細胞では取り込むことのできない大きさの粒子を取  
り込むことができる。細菌などの病原微生物はマクロファージに貪食さ  
れマクロファージ内で分解される。従ってマクロファージの貪食機能の  
生物学的意義の一つは病原微生物に対して傷害を与えることである。と  
ころでマクロファージは貪食によって活性化され、病原微生物に対抗す  
10 ることが可能となる場合がある。これは貪食によるマクロファージ活性  
化として知られる現象であり、これによってマクロファージはがん細胞  
でさえ傷害することが可能になる。従って、マクロファージを貪食によ  
り活性化し、貪食活性を強めることができれば、病原微生物をより強く  
殺滅することが可能となる。

15 粒子がマクロファージに貪食されるためには、以下の性質を備えてい  
る必要があると考えられている（可貪食性）。

すなわち、

- ・ 粒子直径は1～6ミクロンである。このような粒子を微粒子と呼ぶ。
- ・ 粒子表面はマクロファージ培養液（生体内ではマクロファージ周辺の  
20 体液）で濡れるが、直ちには溶解せずに一定時間粒子として存在してい  
る。
- ・ 粒子は20～45℃の温度範囲で固体である。
- ・ 粒子の比重はマクロファージ培養液（生体内ではマクロファージ周辺  
の体液）よりも大きい。

- 25 ・ また、粒子は表面に水やイオンが浸透可能な表面層を持つ。

一方、粒子を生体内に投与することを考慮すると、粒子表面は生体適  
合性の高い高分子層を持っている必要があるし、マクロファージに取り  
込まれるまでは粒子の形態を保持する一方で、マクロファージに取り込

まれた後に、あるいは取り込まれなかった場合にも生体内で生体にとって無毒な成分にまで分解されて代謝される必要がある（生体内分解性）。

以上の2つの条件を満たし、容易に粒子に成型可能な高分子として、ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体（以下「PLGA」という）又は  
5 ポリ乳酸（以下「PL」という）が候補となる。PLはPLGAよりも疎水性が高く、分解までに要する時間が長い。一方PLGAは、モノマー比率に依存して分解速度が変化する。分子量が大きい方が分解までに要する時間は長い。PLGAの分子量が1,000以下の場合には20～45℃の温度範囲で液体として存在する可能性がある。従って、20～45℃の温  
10 度範囲で固体として存在するPLGAの分子量は1,500以上が望ましい。

さらに、PLGA粒子中に含有している薬物の粒子内からの放出は分子量20,000程度のPLGAの場合にはほぼ0次で薬物が放出される。すなわち、放出量が常に一定に保たれる。しかし、分子量44,000及び75,000程度のPLGA粒子からは0次放出ではなく、一定時間後に薬物  
15 が放出されるパルス型になることが観測されている。しかも、パルス型の薬物放出が観測される時間は分子量の大きいPLGA製剤で遅くなっている。すなわち、PLGA粒子からの薬物放出のパターンはPLGAの分子量に依存している。さらに、薬物の放出に関するPLGAの分解速度は、PLGAの分子量増加に伴い遅くなるばかりでなく、マクロ  
20 フェージ内など生体内の方が試験管内よりも早いと予測されるため、分子量は150,000までの範囲であれば生体内で有効に使用可能であると考えられる。

以上の観点から、分子量1,500から150,000、乳酸・グリコール酸のモノマー比50：50から75：25のPLGAから成る、粒子直径が1～6ミク  
25 ロンの微粒子製剤（許容範囲）、分子量5,000から75,000、乳酸・グリコール酸のモノマー比50：50から75：25のPLGAから成る、粒子直径が1～6ミクロンの微粒子製剤（適する範囲）がマクロフェージに貪食されやすく、しかも、マクロフェージ内で薬物を内包する微粒子製剤か

ら薬物が一定の持続性を保ちながら放出されるという目的に対し最適であると考えられる。

感染症病原体を保持したマクロファージの特異的殺滅を可能とする新規

## 5 治療薬の提供

結核菌を始めとした種々の感染性病原体を保持したマクロファージの特異的な貪食活性を積極的に活用して、マクロファージ内の病原体又は病原体を保持したマクロファージそのものを殺滅するためには、下記の治療薬が有効である。

### 10 (1). マクロファージの貪食活性を誘起する治療薬

(2). マクロファージ内の感染病原体に対し直接の殺滅効果をもつ治療薬

(3). マクロファージに作用する治療薬

(1)の治療薬は、前述した2つの条件（可貪食性及び生体内分解性）を満たす性質を持つもので足りるが、好ましくは感染病原体保持/非保持のマクロファージに選択的に貪食され得る性質を有することが望ましい。従来、マクロファージの貪食能を活性化する物質が存在することが知られていた（公知事項）。しかし、この性質を積極的に利用してマクロファージ内の病原体に作用する治療薬を開発する試みは全く為されていない（新規事項）。(2)、(3)のタイプは、病原体に直接作用する種々の薬物が対象になるばかりでなく、病原体保持/非保持マクロファージの生理機能を改変する作用を持つDNA又はRNAなど遺伝子自体も薬物として使用可能である。(1)、(2)、(3)を組み合わせた感染性病原体除去に有効な治療薬を開発する試みは全く為されておらず、本発明の治療薬は、感染性病原体に対する治療に有効な新しいタイプの治療薬である（新規事項）。

例えば、アンチマイクロバイアルエジェント アンド ケモセラピー（Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998年 第42巻 第10号 pp.2682-2689）には、PLGAにリファンピシンを含有する粒子の抗結



核作用が開示されている。ところが、この報告ではP L G A粒子による  
食食活性の誘起に関しては全く述べられていない。さらに、リファンピ  
シン含有P L G A粒子は、単独のリファンピシンに比べ抗結核薬として  
の薬効は向上していないことから、本発明の粒子とは異なった性状を有  
5 していることが明らかである。さらに、図4及び図5に示すようにリフ  
ァンピシンの放出の制御にはP L G Aの分子量が重要である。ところが、  
上記報告には、P L G Aの調製の際に用いたP L G Aの分子量の記載が  
為されていない。おそらく本発明の粒子とは異なる分子量を持つP L G  
Aを用いたために抗結核薬としての機能を有するに至らなかったものと  
10 推測される。抗結核薬活性を有するP L G A粒子の調製に際しては、P  
L G Aの分子量、モノマー比及び調製された粒子の直径に関し適正なも  
の用い、マクロファージの食食による粒子の取り込みとマクロファージ  
内での抗結核活性とを評価しないとイケない。以上の点を総合するなら  
ば、上記論文に記載されているP L G A粒子は、P L G Aのモノマー比、  
15 粒子の直径が本発明における“適する範囲”にあるなど、素材に関し一  
定の共通性が認められるものの粒子に関する正確な性状が記載されてお  
らず、抗結核薬作用をも有していない。従って、本発明の新規性・進歩  
性を否定する先行例とはなり難いものである。

更に、ファーマシューティカル リサーチ (Pharmaceutical  
20 Research 2000年 第17巻 第8号 pp.955-961) に分子量82,500のP  
L G Aを用いて作製したリファンピシン含有粒子の調製方法が開示され  
ているが、この粒子の調製法は本発明とは異なっている。分子量82,500  
のP L G Aを用いたリファンピシン含有P L G A粒子の結核菌殺滅効果  
は、ファーマシューティカル リサーチ (Pharmaceutical Research  
25 2001年 第18巻 第9号 pp.1315-1319) に開示されている。これを見  
ればリファンピシン含有P L G A粒子の抗結核活性は試験管内ではリフ  
ァンピシン単独での効果にも及ばないし、動物実験においても明らかな  
治療効果があるとは言えない。リファンピシン含有P L G A粒子が抗結

核作用を発現するためには、粒子が適度の分解性と高いリファンピシン内包率を有していなければならない。しかし、上述の論文ではこのような活性を左右する性状に関する検討を行わずに、抗結核活性が調べられている。分解性と内包率とは分子量の大きなPLGA粒子では低下することが知られているので、82,500という高い分子量のPLGAを用いたことが抗結核作用を発現しなかった原因であると思われる。以上の様にこれまで本発明で提示しているものと類似の研究が行われてはいるが、本発明のごとく、マクロファージの貪食活性を利用することを意図し、かつこの活性化を達成することを通じて、細胞内寄生病原体の殺滅を図る試みはこれまでに行われていない。また、リファンピシン含有PLGAは調製されてはいるが、本発明の目的を達成することを可能とすることを目的とした調製方法や素材特性に関する適正な研究がなされていない。わずかにファーマシューティカル リサーチ (Pharmaceutical Research 2001年 第18巻 第10号 pp.1405-1410) にリファンピシン含有PLGA粒子がマクロファージに取り込まれることが想定されたとの記載がある。しかし、この場合も積極的にマクロファージに取り込ませること、あるいは活性化を意図した製剤が作製されているわけではなく、実際にリファンピシン含有PLGA粒子の貪食率などは検討されていない。ちなみに、この報告に記載されているリファンピシン含有PLGA粒子を用いた試験管内でのリファンピシンのマクロファージ内濃度はわずかに $0.45 \mu\text{g}/10^6$ 細胞に留まっている。本発明でのリファンピシン含有PLGA微粒子を用いた場合は貪食が活性化されるばかりか、リファンピシンのマクロファージ内濃度は、 $6 \mu\text{g}/10^6$ 細胞に達するのであって、13倍以上にもなる。以上のことは、マクロファージに貪食を誘導しマクロファージ内の病原微生物の殺滅を意図すれば、単に薬剤をミクロスフェアに含有させるだけではこの達成が困難であることが明らかである。しかもこれまでのいかなる報告においても結核菌の標的細胞である肺胞マクロファージを用いてリファンピシン含有PLGA粒子が

細胞内結核菌を殺滅するかを検討した報告は無い。前述の「生命を支えるマクロファージ」を参照すれば明らかなようにマクロファージは組織特異性が高く血中に存在するマクロファージを用いて得られる結果を直ちに組織特異的マクロファージ、例えば肺胞マクロファージ、に対して  
5 も適用可能とすることができないことは周知の事実である。すなわち本発明の新規性は、概念の新規性は言うまでもないが、この概念を支える実施例として、肺胞マクロファージを用いて、しかも該細胞の貪食活性を誘導しかつ、実際に肺胞マクロファージ内で高い薬物濃度を保持し、かつこの製剤が実際に肺胞マクロファージ内結核菌の殺滅がリファピシ  
10 ン単独に比べ明らかに優れたリファンピシン含有PLGA粒子を製造し提供する点が挙げられる。

一方、粒子をマクロファージに貪食させることによって、マクロファージから非特異的な抗菌物質、例えば過酸化水素、酸素ラジカルの産生が増強することは既に広く知られている。例えばヨーロピアン ジャー  
15 ナル オブ ファーマシューティカル サイエンスズ (European Journal of Pharmaceutical Sciences 2000年 第15巻 pp.197-207) には、PLGA粒子を貪食させることで、血中単球に性格の類似した培養マクロファージから過酸化水素の産生が増強することが開示されている。然しながら、マクロファージがPLGAを貪食することにより、貪  
20 食活性が増強することは記載されていない。更にマクロファージの活性化はきわめて多様性に富んでいることから、貪食により過酸化水素の産生が増強することが、直ちに貪食増強と直接に結びつくものではない。

実際の感染症治療に際しては、(1)のタイプの治療薬に(2)又は(3)

(前出では、をつけていない)のタイプの薬物を含有させた製剤が有効  
25 である。つまり、(2)、(3)のタイプの治療薬がマクロファージ内で有効に作用するために、(1)の治療薬は、マクロファージの貪食機能を利用して(2)、(3)のタイプの治療薬をマクロファージ内に運搬する機能を担う。すなわち、本発明の対象となる治療薬は図1に示すように、マクロ

ファージに貪食されやすく、単に治療薬のみを投与した場合よりもマクロファージ内の治療薬の濃度が高くなる。すなわち、右側の従来の薬液内にあるマクロファージに取り込まれる薬剤と比較して、左側の本発明による薬剤封入微粒子は積極的にマクロファージに取り込まれてマクロ  
5 ファージ内の薬剤濃度が高くなる。このように、請求の範囲に記載した「マクロファージの貪食活性を誘起し、」とは、単に治療薬を投与した場合よりもマクロファージ内の治療薬の濃度が高くなることを意味する。

#### 具体的な適用例：結核

10 本発明に提示している治療薬の有効性に関する一例として結核について述べる。結核菌は飛沫により気道から肺胞に侵入し、肺胞マクロファージに貪食される。通常であれば貪食された病原体は、細胞内でタンパク分解酵素の攻撃により分解される運命にある。しかし結核菌はタンパク分解酵素の攻撃を回避して、マクロファージ内で生存する。このマク  
15 ロファージ内の結核菌はマクロファージ外に移行し、持続的に宿主体内に結核菌を供給する。現在抗結核菌薬剤としては、イソニアジド、リファンピシン、硫酸ストレプトマイシン、エタンブタール等の薬物が用いられている。いずれの薬物もマクロファージ外の結核菌に対しては有効であるが、肺胞マクロファージ内の結核菌に対しては効果を示さない。  
20 このことは肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するに十分な薬物濃度が得られないことに主要な原因が求められる。

そこで、肺胞マクロファージの貪食作用を利用して肺胞マクロファージ内に結核菌を殺滅するに十分な薬物濃度が得られれば、肺胞マクロファージ内結核菌をも殺滅することが出来る。この場合貪食作用はマク  
25 ロファージ内の薬物濃度を選択的に上昇せしめるために利用されることになる。

#### A. マクロファージの貪食能を増強させる治療薬

PLGAを例として、マクロファージの食食能を増強させる治療薬の製法及びその効果を説明する。

I. PLGA微粒子製剤によるマクロファージ食食能の増強（本項では

5 PLGA微粒子そのものが薬効成分である。）

#### 1. PLGA微粒子製剤調製法

##### (a) 材料

(1). PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）モノマー比：

10 75：25、分子量20,000（和光純薬株式会社：PLGA-7520）

(2). PVA（ポリビニルアルコール）重合度500

##### (b). PLGA微粒子製剤の調製

(1). PLGA 500mgを塩化メチレン1.5mLに溶解する。

15 (2). PVAを0.3%（w/v）になるように水に溶解する。

(3). (2)のPVA水溶液8mLを(1)の溶液に加えて3分間攪拌すると水中油滴型（o/w型）エマルションが形成される。

(4). (2)のPVA水溶液200mLの中に、(3)を加え、520回転/分で3時間、室温で攪拌する。

20 (5). 遠心分離（3,000回転/分、15分間）によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10mLを加えて2回、遠心分離によって洗浄する。

(6). 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

25 (7). 得られた微粒子製剤の粒子径分布を図2に示す。この図から明らかにように調製した微粒子製剤は直径約2ミクロンにピークを持ち、1～10ミクロンの間に分布を持つ。この粒子は常温で固体である。調製に用いたPLGA（500mg）と回収した製剤の全重量から計算した収率は約90%であった。

## (8) . 他の例

他に作成した P L G A 微粒子 (分子量及び組成) の性状を以下にまとめた。

1. PLGA-5005 (PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 50：50)
- 5 2. PLGA-5010 (PLGA分子量10,000、乳酸／グリコール酸 50：50)
3. PLGA-5020 (PLGA分子量20,000、乳酸／グリコール酸 50：50)
4. PLGA-7505 (PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 75：25)
5. PLGA-7510 (PLGA分子量10,000、乳酸／グリコール酸 75：25)

10 P L G A 微粒子製剤調製法は、P L G A の種類を除き1.(b)(1)～(6)と同様である。

得られた微粒子製剤の平均粒子径はどの P L G A を用いた場合でも約2ミクロンであった。調製に用いた P L G A (500mg) と回収した製剤の全重量から計算した収率は約90%であった。

15 2. P L G A 微粒子製剤を貪食することによる肺胞マクロファージの貪食増強効果

(1). 肺胞マクロファージ細胞 (NR8383細胞) を  $1 \times 10^6$  個/mL に培地 (Ham F-12K, 15% ウシ胎児血清) で調製し、24穴プレートに加え、ここに、PLGA-7520微粒子製剤を0.04、0.4、4 マイクログラム ( $\mu$ g) 添  
20 加し、炭酸ガス培養器 (37℃) で培養する。

(2). 1時間培養後、培養液を除去し、0.25%トリプシン／リン酸緩衝液を含む生理食塩水 (以下 P B S) 0.1mL を添加し室温で5分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。

(3). これに、0.1mL の培地を加え80%パーコール (ファルマシア社) 0.1mL と混ぜ合わせて40%パーコール溶液を調製し、これを1.5mL の  
25 サンプルチューブに入れた70%パーコール0.1mL に重層し、遠心分離 (8,000 回転/分、10分間) する。

(4). 遠心分離後、界面に存在する細胞を回収し、細胞を P B S で洗浄後、

培地を 1 mL 添加し、粒子径 2.0 ミクロンのフルオレセインイソチオシアネート (FITC) でラベルしたポリスチレンラテックス粒子 (FITC-PSLP) を  $1 \times 10^7$  個添加し、1 時間培養する。蛍光性の FITC でラベルするのは定量を容易に行うためである。

5 (5). 培養後、遠心分離 (700 回転/分、5 分間) し、沈降層のマクロファージに PBS を 1 mL 加え、遠心分離操作を、2 回繰り返す。

(6). PBS を除いた後に、細胞に 10% ホルマリン / PBS を 0.1 mL 添加し、5 分間固定後、蒸留水を 1 mL 加え、上清を除き、再度蒸留水を 1 mL 加え、上清を除く。上清を除いた後、0.1 mL の蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液 0.02 mL を取り、スライドグラスに広げ、乾燥させる。

(7). 蛍光顕微鏡下で複数視野撮影行い、細胞 100 個当たりの FITC-PSLP を取り込んだ NR8383 細胞の数を測定する。

15 (8). PLGA 微粒子製剤によるマクロファージの FITC-PSLP 貪食量の変化は表 1 に示すとおりである。PLGA 微粒子製剤は低量の添加ではマクロファージの貪食能に対する効果は顕著ではないが、0.4 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の添加により著しく貪食能を活性化することが明らかである。

表 1 PLGA 微粒子製剤のマクロファージ貪食能に対する増強作用

PLGA 微粒子製剤量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	FITC-PSLP の取り込み率 (%)
0	11.6
0.004	8.8
0.04	12.3
0.4	20.2

20

## II. リポ多糖によるマクロファージ貪食能の増強

### 1. リポ多糖調製法

## (a) 材料

(1). グラム陰性菌パントエア (Pantoea) 属パントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans)

## 5 (b) リポ多糖の調製

(1). 7リットル (L) の肉汁培地 (トリプトン 10 g / L、酵母エキス 5 g / L、NaCl 10 g / L、グルコース 1 g / L、pH 7.5) にパントエア・アグロメランス (Pantoea agglomerans) を加え、35℃で1夜振とう培養し、約70 g の湿菌体を集菌する。

10 (2). 菌体約70 g を500m L の蒸留水に懸濁し、500m L の90%熱フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、水層を回収した。回収した水層を1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を分子量20万カットーオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮する。

(3). 得られた粗リポ多糖凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、陰イオン交換クロマトグラフィー (ファルマシア社製。Q-セファローズ・ファースト・フロー) にかき、10m M トリス-HCl (pH 7.5) 及び10m M のNaCl  
15 を含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400m M NaCl / 10m M トリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させる。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩及び濃縮し、凍結乾燥し、約  
20 70 g の湿菌体から約300m g の精製リポ多糖を得ることができる。

## 2. リポ多糖による肺胞マクロファージの食食増強効果

(1). 肺胞マクロファージ細胞 (NR8383) を  $1 \times 10^6$  個 / m L に培地 (Ham  
25 F-12K, 15%ウシ胎児血清) で調製し、24穴プレートに加え、これに、リポ多糖を  $1 \mu\text{g} / \text{m L}$  になるように添加し、炭酸ガス培養器 (37℃) で培養する。

(2). 1時間培養後、1.5m L のサンプルチューブに細胞を移し、培養液を



遠心分離（2,000 回転/分、5 分間）で除去し、0.25%トリプシン/PBS 0.1mLを添加し室温で5分間放置後、遠心分離（2,000 回転/分、5分間）して培養上清を除き、PBSで洗浄を行う。

5 (3).これに、0.1mLの培地を加え60%パーコール 0.1mLと混ぜ合わせ30%パーコール溶液を調製し、遠心分離（8,000 回転/分、10分間）する。

(4).遠心分離後、液表面に存在する細胞を回収し、細胞をPBSで2回洗浄後、培地を1mL添加し、粒子径2.0ミクロンのFITC-PSLPを $1 \times 10^7$ 個添加し、1時間培養する。

10 (5).培養後、上清を除き、0.25%トリプシン/PBS 0.1mLを添加し室温で5分間放置後、培地を1mL添加し、遠心分離（700 回転/分、5分間）する。

15 (6).沈降層のマクロファージにPBSを1mL加え遠心分離（700 回転/分、5分間）し、上清を除き、再度PBSを1mL添加後、遠心分離（700 回転/分、5分間）し上清を除く。

(7).上清を除いた後に、細胞に10%ホルマリン/PBSを0.1mL添加し、5分間固定後、蒸留水を1mL加え、上清を除き、再度蒸留水を1mL加え、上清を除く。

20 (8).上清を除いた後、0.1mLの蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液0.02mLを取り、スライドグラスに広げ、乾燥させる。

(9).蛍光顕微鏡下で複数視野撮影行い、細胞500個当たりのFITC-PSLPを取り込んだNR8383細胞の数を測定する。

25 (10).リポ多糖によるマクロファージのFITC-PSLP貪食量の増加は表2に示すとおりである。リポ多糖によりマクロファージの貪食能が活性化されたことが明らかである。

表2 リポ多糖によるマクロファージ貪食能の活性化

リポ多糖添加量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	FITC-PSLPの取り込み率 (%)
0	31
1.0	51

## B. マクロファージ内の病原体に作用する治療薬

RFP-PLGA微粒子製剤貪食によるリファンピシン（抗結核菌薬）のマク

## 5 ロファージ内への効果的移行

## 1. リファンピシンを内包したPLGA微粒子製剤の調製

## (a) 材料

10 (1). PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）モノマー比：  
75：25又は50：50、分子量5,000、10,000又は20,000、和光純薬株式会  
社：PLGA-5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520

(2). リファンピシン

(3). PVA（ポリビニルアルコール）重合度500

## 15 (b) RFP-PLGA微粒子製剤の調製

(1). PLGA 500mgとリファンピシン（0, 50, 100, 200mg）を塩  
化メチレン1.5mLに溶解する。

(2). PVAを0.3%（w/v）になるように水に溶解する。

20 (3). (2)のPVA水溶液8mLを(1)の溶液に加えて3分間攪拌するとo/w  
型エマルションが形成される。

(4). (2)のPVA水溶液200mLの中に、(3)を加え、520回転/分で3  
時間、室温で攪拌する。

(5). 遠心分離（3,000回転/分、15分間）によって、微粒子製剤を沈降  
させて分離し、さらに蒸留水10mLを加えて2回、遠心分離によって洗

浄する。

(6). 1 昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

(7). 作成したRFP-PLGA粒子（分子量及び組成）を以下にまとめた。

1. RFP-PLGA5005（PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
- 5 2. RFP-PLGA5010（PLGA分子量10,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
3. RFP-PLGA5020（PLGA分子量20,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
4. RFP-PLGA7505（PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 75：25）
5. RFP-PLGA7510（PLGA分子量10,000、乳酸／グリコール酸 75：25）
6. RFP-PLGA7520（PLGA分子量20,000、乳酸／グリコール酸 75：25）
- 10 得られた微粒子製剤の粒度分布並びに性状は全てP L G Aのみの微粒子製剤（A. I. 1. (b)(7)）と同じものであった。

(8). 500m g の P L G A 中にリファンピシンを0, 50, 100, 200m g 含有させた微粒子製剤 4 m g を塩化メチレン 1 m L に溶解後、475 n m の吸光度を分光光度計で測定する。

- 15 (9). RFP-PLGA微粒子製剤（P L G A 分子量20,000, 乳酸／グリコール酸 75：25よりなる微粒子PLGA-7520）中の回収リファンピシン量を表3に示した。この結果から明らかなように、リファンピシンは効率よく製剤化されていることがわかる。

表3 RFP-PLGA微粒子製剤の内包リファンピシン量

リファンピシン (m g)	P L G A 量 (m g)	内包リファンピシン (%)
0	500	-
50	500	83
100	500	82
200	500	89

## 2. 他のRFP-PLGA微粒子製剤調製法（膜乳化法、公知）

膜乳化法を用いてRFP-PLGA7510微粒子製剤を調製した。

膜乳化法は、2種類の混じりあわない液体の一方（分散相）を加圧して、多孔質ガラス膜（SPG膜）を介して他方の液体（連続相）中に分散させる乳化方法であり、この方法を用いると、均一な粒子径をもつエマル

5 ションを得ることができる。

### (a). 材料

(1). PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）モノマー比：75：25、分子量10,000、和光純薬株式会社：PLGA7510

10 (2). リファンピシン

(3). PVA（ポリビニルアルコール）重合度500

### (b) RFP-PLGA微粒子製剤の調製

(1). PLGA 500mgとリファンピシン100mgを塩化メチレン10mL

15 に溶解する。

(2). PVAを0.3%（w/v）になるように水に溶解する。

(3). (2)のPVA水溶液100mL中にSPG膜（伊勢化学工業 細孔径0.49 $\mu$ m）を介して(1)の溶液を分散すると水中油滴型（o/w型）エマル

20 ションが形成する。

(4). (2)のPVA水溶液200mLの中に、(3)を加え、520回転/分で3時間、室温で攪拌する。

(5). 遠心分離（3,000回転/分、15分間）によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10mLを加えて2回、遠心分離によって洗

25 浄する。

(6). 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

(7). 得られた微粒子製剤の平均粒子径は1.98ミクロンである。調製に用いたPLGA（500mg）と回収した製剤の全重量から計算したPLGAの収率は約90%であった。また、リファンピシンの収率は約75%であ

った。この粒子は常温で固体である。

### 3. 膜乳化法による他の例

膜乳化法を用いて調製したRFP-PLGA7510微粒子製剤以外のRFP-PLGA微  
5 粒子（分子量及び組成）を以下にまとめた。

1. RFP-PLGA5005（PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
2. RFP-PLGA5010（PLGA分子量10,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
3. RFP-PLGA5020（PLGA分子量20,000、乳酸／グリコール酸 50：50）
4. RFP-PLGA7505（PLGA分子量5,000、乳酸／グリコール酸 75：25）
- 10 5. RFP-PLGA7520（PLGA分子量20,000、乳酸／グリコール酸 75：25）

これらのRFP-PLGA微粒子製剤調製法は、P L G Aの種類を除き上記の膜乳化法と同様である。

得られた微粒子製剤の平均粒子径はPLGA5005では、2.20ミクロン、PLGA5010では、2.66ミクロン、PLGA5020では、2.29ミクロン、PLGA7505  
15 では、2.00ミクロン、PLGA7520では、1.85ミクロンである。調製に用いたP L G A（500m g）と回収した製剤の全重量から計算したP L G Aの収率は全て約90%であった。また、リファンピシンの収率はPLGA5005では、約87%、PLGA5010では、約78%、PLGA5020では、約67%、PLGA7505では、約91%、PLGA7520では、約58%であった。

20

### 4. RFP-PLGA微粒子からのリファンピシンの放出

- (1). 膜乳化法により調製した各RFP-PLGA微粒子50m gを37℃（温度）に保持したpH7.4 リン酸緩衝液（イオン強度0.154M）5 m Lに分散した。
- (2). 経時的に遠心分離により上清を採取し、残存した微粒子にpH7.4  
25 リン酸緩衝液（イオン強度0.154M）5 m Lを加えた。
- (3). 上清に溶出したリファンピシン濃度を測定した。測定には、分光光度計を用いて475 n mの波長で測定した。
- (4). 各RFP-PLGA微粒子から上清に放出されたリファンピシンの割合を図

4 及び図 5 に示した。本実験データからは P L G A の分子量が 5,000 及び 10,000 である PLGA5005、PLGA5010 と PLGA7505、PLGA7510 からはリファンピシン放出速度が速いことが示された。これらの結果から P L G A の組成は分子量 5,000 ~ 10,000、乳酸とグリコール酸の比が 50 : 50 又は 5 75 : 25 がマクロファージへの貪食を介した薬剤の移行に優れていることが示された。

#### 5. RFP-PLGA 微粒子製剤 (PLGA-7520) の貪食による細胞内リファンピシン濃度の選択的増加

- 10 (1). 調製した RFP-PLGA 微粒子製剤を P B S に微粒子製剤を再分散させ、遠心分離 (400 回転/分、5 分間) を行って大きな粒子を除き、顕微鏡観察により約 1 ~ 3 ミクロンのサイズに調製した微粒子製剤 (重量で約 30%) を以後の実験に用いる。
- (2).  $5 \times 10^5$  個 / 0.9 mL に培地で培養した NR8383 細胞を、24 穴プレート 15 に入れ、これに各 RFP-PLGA 微粒子製剤 0.12 mg / 0.1 mL を添加し、12 時間培養する。
- (3). 培養後、培養液を除去し、0.25% トリプシン / P B S 0.1 mL を添加し室温で 5 分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。
- (4). これに、0.1 mL の培地を加え 80% パーコール 0.1 mL と混ぜ合わせ 20 40% パーコール溶液とし、これを 1.5 mL のサンプルチューブに入れた 70% パーコール 0.1 mL に重層し、遠心分離 (8,000 回転/分、10 分間) する。
- (5). 遠心分離後、界面に存在する細胞を回収し、細胞を P B S で洗浄後、細胞中に取り込まれたリファンピシンを塩化メチレンで抽出する。
- 25 (6). リファンピシンの量は 475 nm の吸光度から決定する。
- (7). 対照として各 RFP-PLGA 微粒子製剤 0.12 mg 中に含まれる同量のリファンピシンのジメチルスルホキシド (D M S O) 溶液を調製し、これを 1 mL の培地を加えた 24 穴プレートに加え、それに NR8383 細胞を添加す

る。

(8). 細胞を12時間培養後、細胞 ( $5 \times 10^5$ 個) を回収し、細胞中のリファンピシンを塩化メチレンで抽出する。

(9). リファンピシンのマクロファージによる取り込み量を図3に示す。

- 5 リファンピシンの添加量が  $40 (\mu\text{g} / 5 \times 10^5 \text{個/穴/mL})$  において、従来のリファンピシンを含む培地と比較して、本実施例のRFP-PLGA微粒子製剤の場合は約19倍ものリファンピシンを取り込んでいることが示されている。

- 10 C. マクロファージの貪食能を増強しマクロファージ内の病原体に作用する薬物 (A + B)

RFP-PLGA微粒子製剤貪食によるマクロファージの貪食活性増強効果

#### 1. RFP-PLGA微粒子製剤の調製

##### (a) 材料

- 15 (1). (1) P L G A (ポリ (乳酸 / グリコール酸) 共重合体) モノマー比 : 75 : 25又は50 : 50、分子量5,000、10,000又は20,000、和光純薬株式会社 : PLGA-5005, 5010, 5020, 7505, 7510, 7520
- (2). リファンピシン
- (3). P V A (ポリビニルアルコール) 重合度500

20

##### (b) RFP-PLGA微粒子製剤の調製

- (1). P L G A 500m g とリファンピシン100m g を塩化メチレン1.5m L に溶解する。
- (2). P V A を0.3% (w / v) になるように水に溶解する。
- 25 (3). (2) の P V A 水溶液 8 m L を (1) の溶液に加えて3分間攪拌すると o / w 型エマルションが形成される。
- (4). (2) の P V A 水溶液 200 m L の中に、(3) を加え、520 回転 / 分で 3 時間、室温で攪拌する。

(5). 遠心分離 (3,000 回転/分、15分間) によって、微粒子製剤を沈降させて分離し、さらに蒸留水10 mLを加えて2回、遠心分離によって洗浄する。

(6). 1昼夜デシケータ内で減圧乾燥。

5 (7). 得られた微粒子製剤の粒度分布並びに性状はPLGAのみの微粒子製剤 (A. I. 1. (a)(7)) と同じものであった。

(8). PBSに微粒子製剤を再分散させ、遠心分離 (400 回転/分、5分間) にて大きな微粒子製剤を除き、顕微鏡観察で約1~3ミクロンのサイズに調整した微粒子製剤を以後の実験に用いる。

10

2. RFP-PLGA微粒子 (PLGA-7520) 製剤の貪食によるマクロファージ貪食活性増強

(1). 肺胞マクロファージ細胞 (NR8383) を  $1 \times 10^6$  個/mLに培地 (Ham F-12K, 15%ウシ胎児血清) で調製し、24穴プレートに加え、ここに、

15 PLGA微粒子製剤を0.012、0.12、 $1.2 \mu\text{g}$  添加し、炭酸ガス培養器 (37°C) で培養する。

(2). 1時間培養後、1.5mLのサンプルチューブに細胞を移し、培養液を除去し、0.25%トリプシン/PBS 0.1mLを添加し室温で5分間放置後、培養上清を除き、洗浄を行う。

20 (3). これに、0.1mLの培地と90%パーコール0.1mLを加えパーコール濃度を45%とした後に、遠心分離 (8,000 回転/分、10分間) する。

(4). 遠心分離後、液表面の細胞を回収し、この細胞をPBSで2回洗浄後、(1)で用いたのと同じ培地を1mL添加し、粒子径2.0ミクロンのFITC-PSLPを  $1 \times 10^7$  個添加し、1時間培養する。

25 (5). 培養後、上清を除き、0.25%トリプシン/PBS 0.1mLを添加し室温で5分間放置後、培地を1mL添加し、遠心分離 (700 回転/分、5分間) する。

(6). 沈降層のマクロファージにPBSを1mL加え遠心分離 (700 回



転/分、5分間) し、上清を除き、再度 P B S を 1 m L 添加後、遠心分離 (700 回転/分、5分間) し上清を除く。

(7). 上清を除いた後に、細胞に 10% ホルマリン / P B S を 0.1 m L 添加し、5分間固定後、蒸留水を 1 m L 加え、遠心分離 (700 回転/分、5

5 分間) し、上清を除く。これに、0.1 m L の蒸留水を加え細胞を懸濁させ、その懸濁液 0.02 m L を取り、スライドガラスに広げ、乾燥させる。

(8). 蛍光顕微鏡下で複数視野撮影行い、細胞 500 個当たりの FITC-PSLP を取り込んだマクロファージ (NR8383 細胞) の数を測定する。

(9). RFP-PLGA 微粒子製剤貪食によるマクロファージの FITC-PSLP 貪食量の増加は表 4 に示すとおりである。RFP-PLGA 微粒子製剤によりマクロファージの貪食能が活性化されたことが明らかである。

表 4 RFP-PLGA 微粒子製剤を貪食した NR8383 細胞の FITC-PSLP 貪食増強作用

RFP-PLGA 微粒子製剤量 ( $\mu$ g / m L )	FITC-PSLP の取り込み率 (%)
0	31
0.012	45
0.12	47
1.2	52

15

以上の結果から、(1) P L G A 微粒子製剤及びリポ多糖はマクロファージの貪食能を活性化することが明らかになった。また、(2) リファンピシンのマクロファージ内への移行は P L G A 微粒子製剤中に包含されることによって格段に増大すること、及び (3) P L G A 微粒子製剤内に  
 20 リファンピシンが含有されていても、マクロファージ貪食能は活性化されることが明らかになった。従って、リファンピシン含有 P L G A 微粒子製剤は、マクロファージの貪食能を活性化し、その結果リファンピシンのマクロファージ内濃度は増大し、マクロファージ内に保持されてい

る病原体に対して効率的に作用させるという本発明の目的を達成することが可能となる。上記の結果は、本発明の基本概念である“マクロファージの貪食活性を誘起”することにより、マクロファージ内の病原体に作用する治療薬をマクロファージ内に有効に取り込ませる新規治療薬の一例を示すものである。

### 3. RFP-PLGA微粒子製剤の貪食によるマクロファージ内結核菌殺滅効果

#### (a)マクロファージ内結核菌（BCG）の生存率測定法

- (1). 乾燥BCGワクチンを生理食塩水で溶解し（12mg/mL）攪拌した後、KRD培地（3～4mL）をT-25培養フラスコに移しBCG懸濁液を40μL入れ、乾式インキュベーター37℃で培養した。
- (2). 実験には菌液とガラスビーズを1：4の割合でサンプルチューブに入れ、ボルテックスミキサーで1分間攪拌後、さらに、超音波洗浄機での5分間の超音波処理によって菌体の分散を行った。
- (3). NR8383を $1 \times 10^6$ 個/mLの濃度で6穴プレートに入れた（全体積5mL）。結核菌（BCG）を細胞当たり10個（multiplicity of infection (MOI) = 10）で細胞培養液に添加した。
- (4). 37℃、炭酸ガス培養器で4時間感染させたのち、2,000回転/分、5分間（SCT15B）遠心後、上清を除いた。無血清培地を用いて同様に遠心を2回繰り返し細胞の外にいる菌を除いた。
- (5). NR8383を $1 \times 10^6$ 個/mLの濃度で24穴プレートに蒔いた。
- (6). NR8383に各RFP-PLGA微粒子を細胞1個あたり10個の割合で培養液に添加した。
- (7). 37℃、炭酸ガス培養器で4時間貪食させたのち、細胞外にある粒子を0.25%トリプシンを用いて除外した。
- (8). 80%パーコールを加えて40%パーコール-細胞液を作り、更に70%パーコールを加え密度勾配を作った。10,000回転/分、5分間（SORVALL Biofuge fresco）遠心後、40%、70%パーコール間の界面の

細胞を回収し、細胞とRFP-PLGAを分離した。

(9). P B Sを用いて同様に遠心を2回繰り返しパーコールを除いた。

(10). フルオレッセインジアセテート ( F D A /、Fluorescein diacetate) /エチジウムブロマイド (Ethidium bromide、E B) 染

5 色法を用いて生菌と死菌の比率を測定した。F D Aは5 m g /m Lの濃度でアセトンに溶解し、使用時に20  $\mu$  Lを1 m LのP B Sで希釈した。

E Bは20  $\mu$  g/m Lの濃度でP B Sに溶解し、使用時に50  $\mu$  Lを1 m L P B Sで希釈して用いた。染色は希釈したF D AとE Bを等量混ぜて使用した。この混合液を1  $\mu$  Lスライドガラス上にのせ、その上に1  $\mu$  L

10 菌液をのせ2分間室温におき蛍光顕微鏡で観察した。生菌は菌由来のエステラーゼ活性によりF D Aが分解され、緑色の蛍光を発する。一方、死菌はエステラーゼ活性がないため、F D Aによる染色は見られず、E Bに染色されオレンジ色の蛍光を発する。

(b) 貪食によりマクロファージ内に取り込まれたRFP-PLGA微粒子製剤  
15 の結核菌殺滅効果

(1). RFP-PLGA微粒子によるマクロファージ内の結核菌殺滅効果を調べるために、予め結核菌を貪食したマクロファージ (結核菌感染マクロファージ) にRFP-PLGA微粒子を投与し、この微粒子をマクロファージに貪食させた。

20 (2). 貪食によりマクロファージ内に移行したRFP-PLGAがマクロファージ内結核菌に対しどのような殺滅効果を示すかを調べた結果を図6に示した。単独のリファンピシン (100  $\mu$  g /m L) よりも約20分の1のリファンピシン含有のRFP-PLGA微粒子投与量でも (MOI=10、推定リファンピシン量5  $\mu$  g/m Lであるので、微粒子製剤中のリファンピシンはリファンピ  
25 シンを単独に投与した場合の20分の1量に相当する。)、リファンピシンの細胞内濃度が有意に高くなることが明らかである。結核菌感染肺胞マクロファージへのRFP-PLGA微粒子の投与は、単独投与のリファンピシンに比べて細胞内の結核菌を20倍以上の効率で殺滅した。すなわち粒子

の貪食を介する薬剤投与によることで、薬剤そのものの抗結核作用にかかわらず20倍以上の治療係数の向上が得られた。

マクロファージの貪食活性を誘起し機能異常の状態にあるマクロファージ

## 5 ジに作用する治療薬の提供

がん組織には、通常多数のマクロファージが浸潤していることが知られている。これはがん細胞が生体にとって異物であるために、がん細胞を排除する目的でマクロファージが集積することに基づく。マクロファージ機能が正常であれば、がん細胞は傷害され消滅するが、マクロファージの機能に異常があれば、がん細胞を傷害できずがん細胞は成長し、腫瘍塊を形成するに至る。ところで既に述べたように、マクロファージの活性化によってマクロファージはがん細胞に対しても傷害を与えることが可能になる。従って、マクロファージの貪食活性を誘起することで機能異常となったマクロファージにがん細胞傷害作用を獲得させ、がんを有効に治療することができ得る。

一方、表2に示したように肺胞マクロファージの貪食作用はリポ多糖（ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の処理により166%も増強し、リポ多糖により肺胞マクロファージが活性化された。そこで、貪食能をリポ多糖により活性化された肺胞マクロファージは肺がん細胞に対して細胞傷害作用を発現すると考えられる。従って、ここでは、リポ多糖による活性化肺胞マクロファージの肺がん細胞傷害作用の例を示すものである。

具体的な適用例：肺がん

肺胞マクロファージを活性化することによる肺がん細胞傷害効果を適用例として示す。

1. リポ多糖による肺胞マクロファージの活性化及び肺胞マクロファージと佐藤肺癌細胞の共培養

(1). NR8383を  $1 \times 10^6$  個/mL の濃度で24穴プレートに入れた（全体積

1.5mL)。コントロールとして5%ウシ胎児血清、F-12K培地150 $\mu$ L、10 $\mu$ g/mL リポ多糖を150 $\mu$ L加えた。

(2).37℃、炭酸ガス培養器で24時間放置した。

(3).佐藤肺癌細胞を $1 \times 10^5$ 個/mLの濃度に調製し、96穴プレートに  
5 1穴あたり50 $\mu$ L加えた。

(4). (1)の項で処理したNR8383を、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ 個/mLの濃度に調製し、96穴プレートに50 $\mu$ L入れた(全体積100 $\mu$ L)。

(5).37℃、炭酸ガス培養器で4時間放置した。

10 2. 佐藤肺癌細胞と共培養したマクロファージの肺癌細胞に対する傷害作用

(1).1に記した、リポ多糖による活性化され、佐藤肺癌細胞と共培養したマクロファージのがん細胞に対する傷害効果を細胞内から培養液中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ量から評価するため、1,000回転/分  
15 で5分間遠心後、上清50 $\mu$ Lを別の96穴プレートに分取した。

(2).引き続き、乳酸デヒドロゲナーゼ量を測定するキット(CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, cat.G1780)に付属している基質溶液50 $\mu$ Lを加えた。なお、ポジティブコントロールとして、  
20 キットに付属している乳酸デヒドロゲナーゼ酵素希釈液(5000倍希釈液50 $\mu$ L)を用いた。

(3).アルミホイルで遮光し、室温、30分間放置した。

(4).停止液50 $\mu$ Lを加え、反応を停止させた。

(5).マイクロプレートリーダー(Model 550, BIO-RAD社)を用いて、495nmにおける吸光度を測定した。

25 (6).各吸光度から、細胞毒性(%)を算出した。

(7).NR8383の佐藤肺癌細胞に及ぼす細胞毒性効果を図7に示す。リポ多糖未処理のNR8383に比べ、リポ多糖処理したNR8383は貪食が亢進しその結果佐藤肺癌への細胞傷害効果は、細胞比に依存して増強していること

が示された。

マクロファージの貪食活性を誘起し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導する治療薬の提供

- 5      本実施の形態の治療薬は、マクロファージの貪食活性を誘起することにより、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする。

- 表2で示したように、マクロファージ活性化剤としてよく知られている  
10      リポ多糖はマクロファージの貪食活性を誘起する。また、マクロファージ活性化因子の代表的なサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ も貪食活性を誘起する。すなわち、マクロファージの貪食活性の誘起はマクロファージ活性化の指標の一つである。本件で示した貪食による貪食活性の誘起は、貪食という刺激が貪食誘起というマクロファージの活性化を  
15      誘導したといえる。また、リポ多糖やインターフェロン $\gamma$ によるマクロファージの活性化に伴い、マクロファージの膜構造の変化が誘起され、マクロファージ内に膜結合型腫瘍壊死因子(TNF)が誘導されることが知られている。従って、貪食という刺激によるマクロファージの活性化に伴い膜結合型TNFが誘導されることになる。

- 20      エイズはエイズウイルス感染によって、T細胞が破壊され、免疫応答が不全となることで発症する。ところで、エイズウイルス感染はT細胞に感染するだけでなく、マクロファージに感染する。この感染はエイズウイルスがT細胞、マクロファージ細胞膜上に共通して発現するCD4タンパク質に吸着することで始まることによる。エイズウイルスが感染  
25      したマクロファージは、細胞死に陥ることなく持続的にエイズウイルスを産生しII. (2)で詳述したごとく感染病原体媒体となる。

従って、エイズウイルスが感染したマクロファージを細胞死に誘導することができれば、感染病原体媒体の殺滅が達成されることになる。

この可能性を実現させ得る一例として、膜結合型 T N F がエイズウイルス (H I V) に感染したマクロファージ細胞に作用して該細胞を特異的に細胞死に誘導し得ることを示す。

5 具体的な適用例：膜結合型 T N F 発現細胞による H I V 感染細胞死の誘導

T N F が病原体に感染した細胞に対して細胞死を誘導する実施例として H I V 感染モルト 4 (MOLT-4) 細胞に対する T N F の作用を示す。

1. 膜結合型 T N F 発現細胞の作製

- 10 (1). 膜結合型 T N F を安定に発現させるために既報 (ジャーナルオブビ  
ィロロジー Journal of Virology 1889年、第63巻、pp. 2504-2509)  
に従いマウス及びヒト膜結合型 T N F 発現プラスミド (pMT2  $\beta$  G/Hu-  
proTNF) を作製した。

- 15 (2). ついで、この発現プラスミドを形質転換株選択用にネオマイシン耐  
性遺伝子を組み込んだプラスミドと 10 : 1 の比率で混合し、マウス胎児  
由来繊維芽細胞 (NIH3T3細胞) に導入した。

(3). 上記、形質転換操作を行った NIH3T3細胞を、選択マーカであるネ  
オマイシン 800  $\mu$  g / m L の存在下、37℃、炭酸ガス培養器内にて、約 2  
週間培養した。

- 20 (4). 培養後、細胞に組み込まれた T N F のクローンを取得した。

(5). 取得したクローンは、膜結合型 T N F を発現していることを酵素免  
疫測定法にて確認した。

2. H I V 感染モルト 4 細胞の調製

- 25 (1). H I V 感染細胞は、37℃、炭酸ガス培養器内にて、培地 (RPMI1640,  
10% ウシ胎児血清及びペニシリン (100 U / m L) 、ストレプトマイシン  
(100  $\mu$  g / m L) を添加) 中で、モルト 4 に、H I V 感染細胞 (HTLV-  
IIIB株) を用いて、既報 (ジャーナルオブビィロロジー 1889年、第63  
巻、pp. 2504-2509) に従って感染させた。モルト 4 細胞にエイズウイ

ルス感染が成立すると、モルト 4 細胞は持続的にエイズウイルスを産生し続ける特徴を示す。従って、エイズウイルス産生に関してみれば、モルト 4 細胞はエイズウイルス感染マクロファージのモデルである。

(2). この感染条件にて、H I V 感染モルト 4 細胞の 90% 以上が H I V 抗体に陽性となった。

(3). 従って、H I V 感染細胞によって、H I V はモルト 4 細胞の殆ど全てに導入され、H I V 感染モルト 4 細胞が調製されたことになる。

### 3. 膜結合型 T N F 発現細胞による H I V 感染細胞の細胞死誘導

(1). T N F のプラスミドを導入した NIH3T3 細胞を 24 穴培養プレートにほぼプレート一面になるように培養した。

(2). 次いで、一定量の H I V 感染モルト 4 細胞を加えて 3 日間、37℃、炭酸ガス培養器内にて混合培養した。

(3). 発現した膜結合型 T N F の H I V 感染細胞に対する作用を調べるために、H I V 感染細胞の生存率をトリパンブルー色素排除法にて測定した。

(4). その結果、H I V に感染したモルト 4 細胞の 40% が膜結合型 T N F 発現細胞との混合培養で細胞死することが認められた。

以上の例から明らかなように、膜結合型 T N F はエイズウイルス (H I V) に感染した細胞に対して、特異的に細胞死を誘導することが明らかである。このことから、病原体を保持することにより機能異常となったマクロファージが、病原体を貪食することにより活性化され、その結果誘導された膜結合型 T N F が、病原体感染マクロファージを細胞死に誘導すると見ることができる。

マクロファージが病原体を保持することによる疾患には、抗酸菌症、エイズ、クラミジア症、又は、トキソプラズマ症などがあり、抗酸菌症には、マイコバクテリウム ツベルクローシス (Mycobacterium



tuberculosis)、若しくはマイコバクテリウム ボビス (Mycobacterium bovis) を原因菌とする結核、マイコバクテリウム レプラ (Mycobacterium Leprae) を原因菌とするライ、又はマイコバクテリウム アビウム (Mycobacterium avium) 他を原因菌とする非定  
5 型抗酸菌症などがあり、クラミジア症の原因菌としてはクラミジア ニューモニア (Chlamydia pneumoniae)、クラミジア トラコマティス (Chlamydia trachomatis)、又はクラミジア シッタシ (Chlamydia psittaci) などがあり、いずれも本発明を有効に適用できる。ところで、  
本実施の形態で示したRFP-PLGA微粒子のマクロファージ内結核菌殺滅効  
10 果は、貪食誘起によって食胞内に取り込まれたRFP-PLGA微粒子からリファンピシンが遊離し、食胞膜を透過し、さらに結核菌含有食胞の食胞膜を透過するという、少なくとも2回の細胞内小胞膜構造の通過がなければ、達成されない。上記に示した原因菌のマクロファージ内での生残戦略は様々である。抗酸菌症全般、レジオネラ、トキソプラズマは食胞内  
15 に原因菌が生残することで、マクロファージ内で生存する。リステリア、クラミジアは原因菌が、食胞から脱出する特徴を有する。これら原因菌の細胞内生存態様は、食胞内に原因菌が存在する場合と比べ、薬剤の到達の観点からみれば、薬剤が一度食胞膜を透過すれば薬効が期待できるので、より容易であると推定される。また、エイズでは細胞内に存在す  
20 る原因菌に薬剤が到達すれば薬効が期待できる点で、リステリアなどと同様である。以上のことから本発明は上記記載の原因菌に対しても有望な治療である。

また、本発明を有効に適用できる各疾患に対する薬品を以下に挙げる。

- 25 1) 抗酸菌症：リファンピシン、イソニアジド、エタンブトール、ピラジナミド、アジスロマイシン、カナマイシン、硫酸ストレプトマイシン、エンビオマイシン、エチオナミド、サイクロセリン、レボフロキサシン、ジアフェニルスルフォン。

- 2) エイズ：アジドチミジン、ジデオキシイノシン。
- 3) クラミジア症：塩酸ミノサイクリン、塩酸ドキシサイクリン、クラリスロマイシン、スパルフロキサシン、ロキシロマイシン、レボフロキサシン。
- 5 4) トキソプラズマ症：ピリメサミン、スルファモノメトキシシン、アセチルスルピラマイシン。
- 5) マラリア症：燐酸クロロキン、硫酸キニーネ、スルファドキシシン、メフロキン。
- 6) がん：5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、シスプラチン、
- 10 エトポシド、マイトマイシン、ピンクリスチン、タキソール、カンプトテシン、ビンブラスチン、サイクロフォスファマイド、ブレオマイシン。
- 7) クローン病：サラゾスルファピリジン、グルココルチコイド。
- 8) リュウマチ：金チオリンゴ酸ナトリウム、ペニシラミン、ブシラミン、グルココルチコイド。

15

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

- 20 本発明により、マクロファージの機能異常のため、又は、マクロファージを媒体して罹患する疾病を効果的に治療することができる治療薬を提供することができる。

## 請 求 の 範 囲

1. マクロファージの貪食活性を誘起し、マクロファージ内に存在する病原体の全てもしくは一部を殺して消滅させることを特徴とする治療薬。
- 5
2. マクロファージの貪食活性を誘起し、病原体を保持するマクロファージを細胞死に誘導することを特徴とする治療薬。
- 10
3. マクロファージの貪食活性を誘起し、機能異常の状態にあるマクロファージに作用することを特徴とする治療薬。
4. 抗酸菌症、エイズ、クラミジア症又はトキソプラズマ症に対するものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の治療薬。
- 15
5. クローン病、リウマチ、がん又は免疫不全症候群に対するものであることを特徴とする請求項 2 又は 3 記載の治療薬。
6. 前記マクロファージは、粘膜組織に常在するものであることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれかに記載の治療薬
- 20
7. 前記マクロファージは、腹腔、大網、乳斑、肺胞、肺間質、肝臓、門脈域、脾臓、骨髓、胸腺、消化管、口腔偏頭、副腎、脳下垂体、甲状腺間質、ランゲルハンス島、副甲状腺、松果体、精巣、卵巢、卵管、子宮、胎盤、皮膚、髄膜、脳質、脈絡叢のいずれかに常在するもの、又は、前記マクロファージは、マイクログリア、マイクログリアの前駆細胞、グリア細胞、グリア細胞の前駆細胞、前記常在マクロファージの前駆細胞、常在マクロファージ類縁細胞、若しくは常在マクロファージ類縁細胞
- 25

胞の前駆細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 いずれかに記載の  
治療薬。

8. PLGA（ポリ（乳酸／グリコール酸）共重合体）を含み、結核  
5 に対するものであることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 6 記載の治  
療薬。

9. さらに、リファンピシンを含むことを特徴とする請求項 8 記載の  
治療薬。

10

10. 分子量1,500から150,000のPLGAを含むことを特徴とする請  
求項 1 乃至 9 いずれかに記載の治療薬。

11. 分子量1,500から75,000のPLGAを含むことを特徴とする請  
15 求項 1 乃至 9 いずれかに記載の治療薬。

12. さらにPVA（ポリビニルアルコール）、PEG（ポリエチレ  
ングリコール）、PEO（ポリエチレンオキシド）、糖、タンパク質、  
ペプチド、リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含むことを  
20 特徴とする請求項 1 乃至 11 いずれかに記載の治療薬。

13. さらに、PVA、PEG、PEO、糖、タンパク質、ペプチド、  
リン脂質又はコレステロールの少なくとも1つを含み、主たる粒子直径  
が1～6ミクロンである微粒子製剤であることを特徴とする請求項 8 又  
25 は 9 記載の治療薬。

図 1

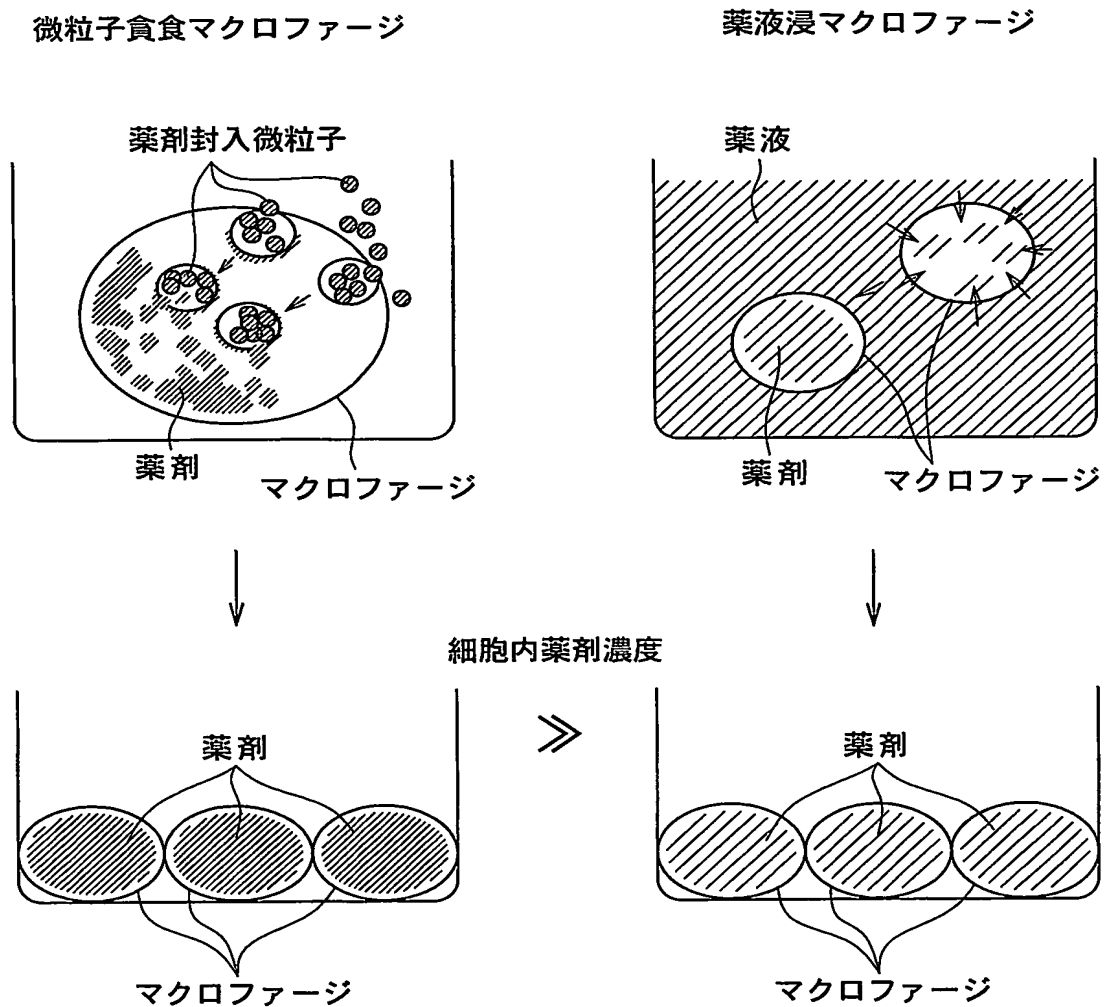


図 2

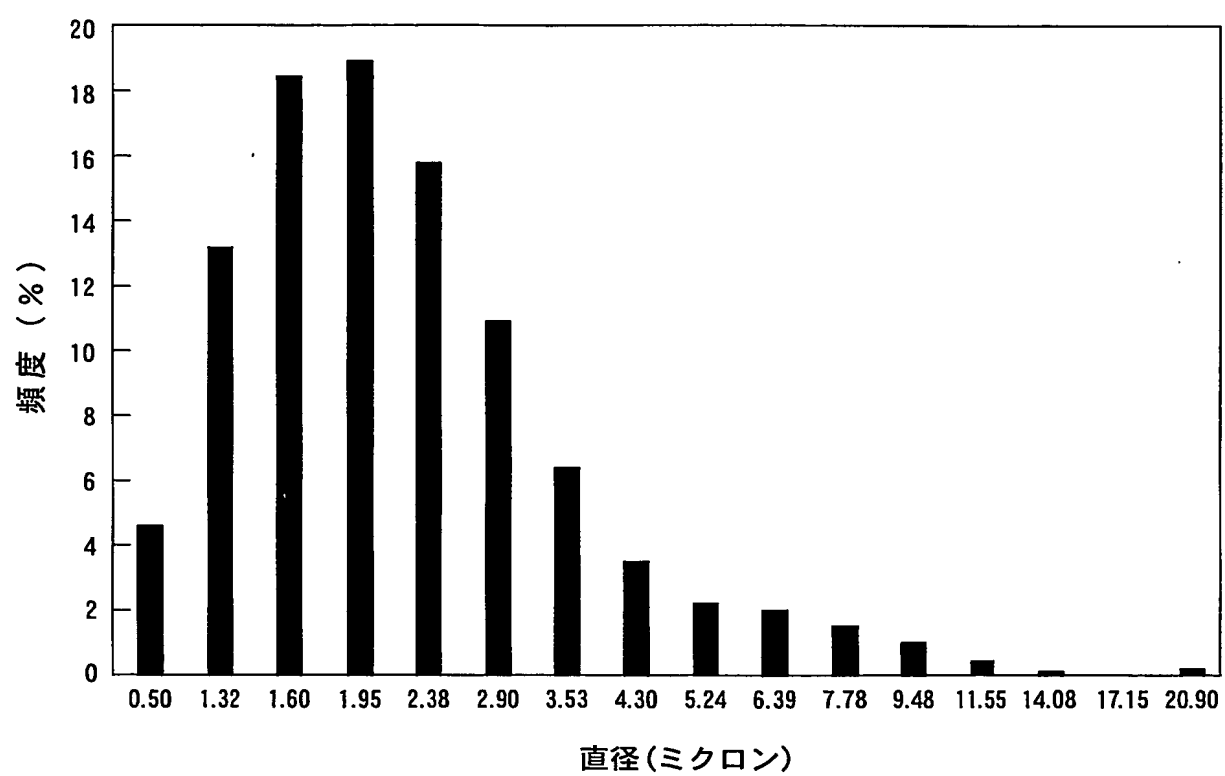


図 3

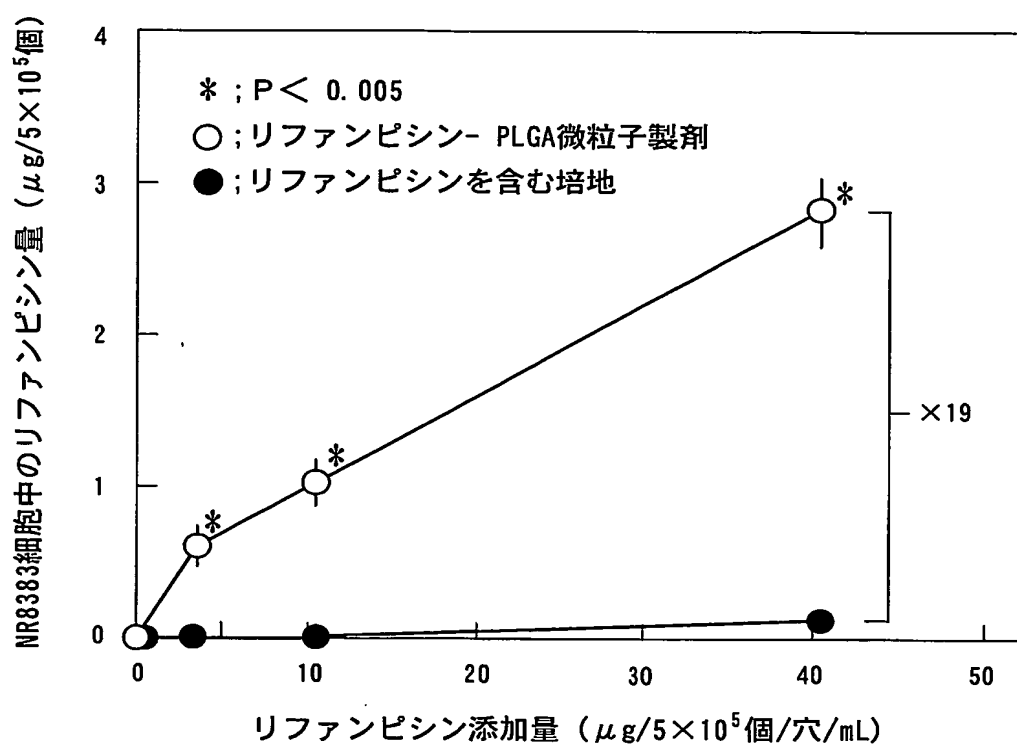


図 4

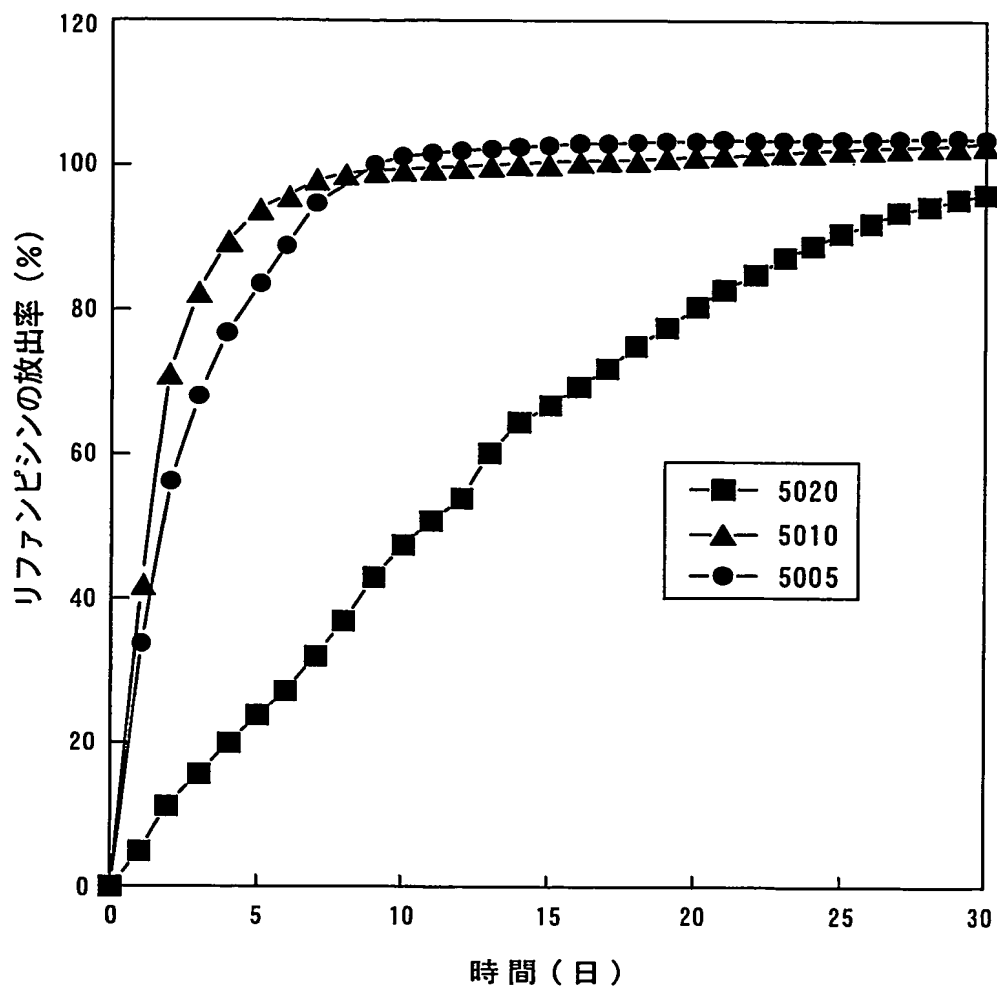




図 5

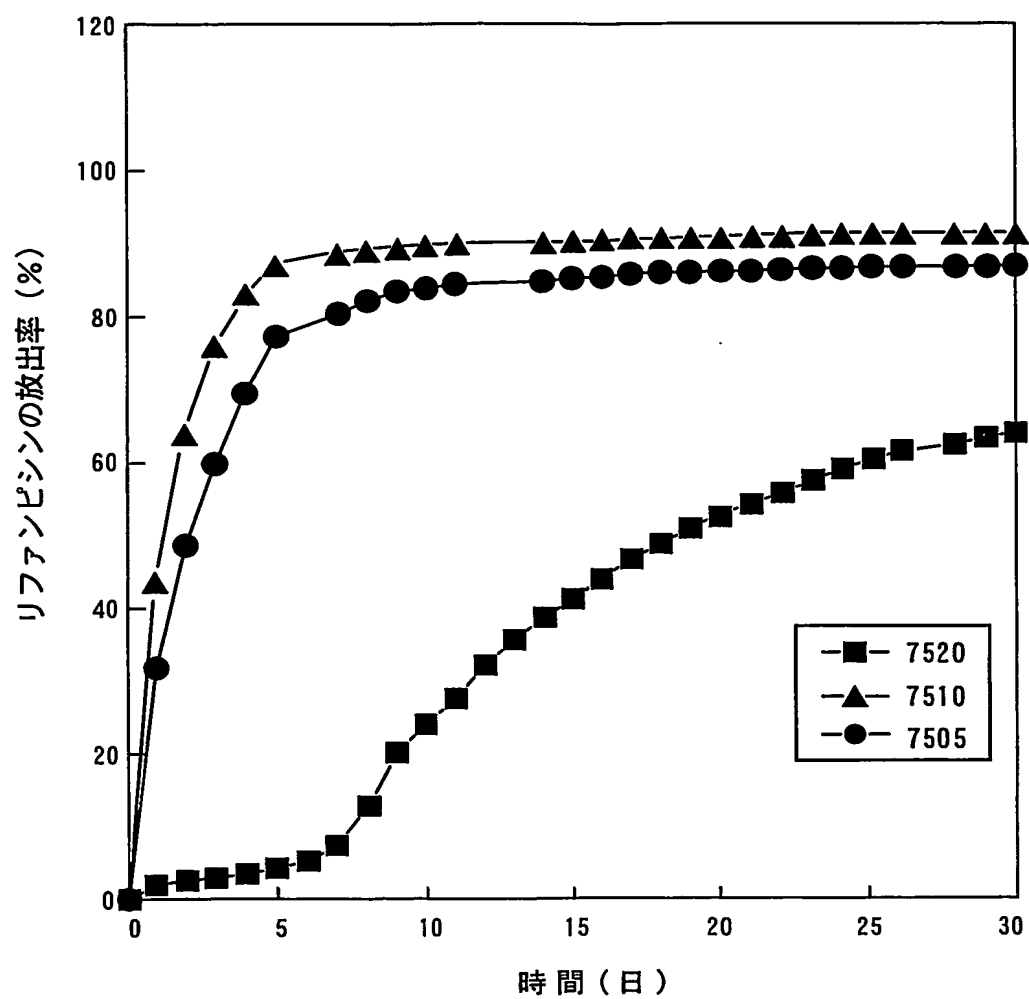


図 6

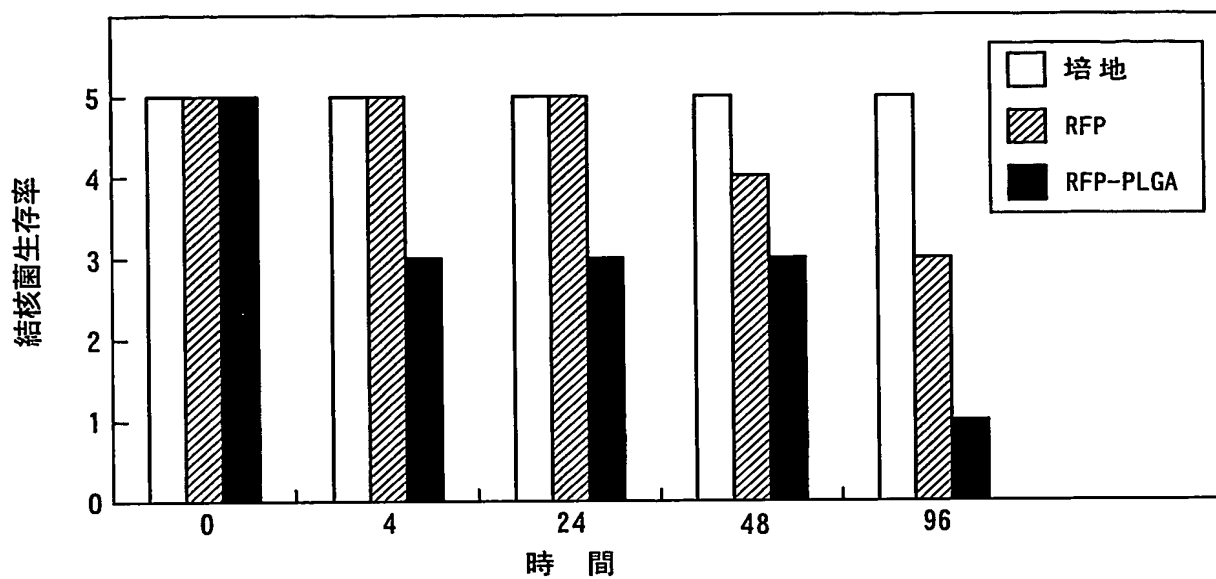
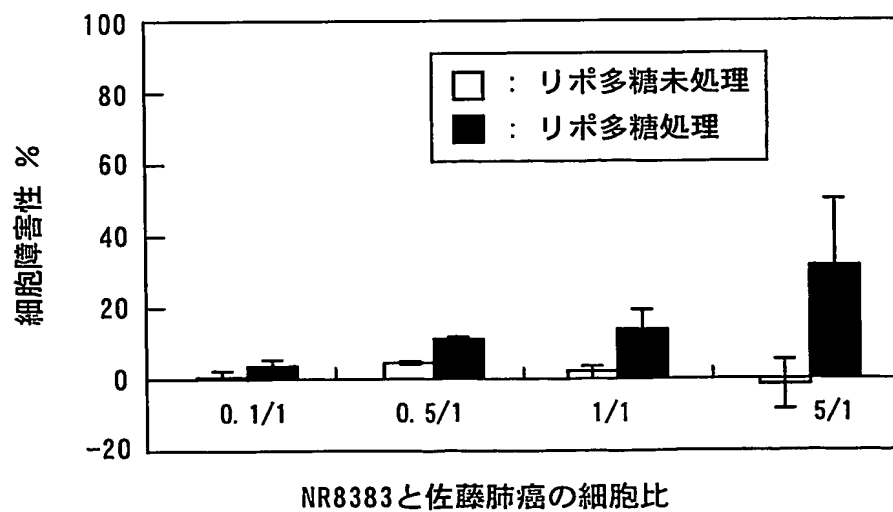


図 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10871

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34, A61P1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02, 35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D498/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34, A61P1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02, 35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D498/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	O' HARA, P. et al., Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization, Pharm.Res., 2000, Vol.17, No.8, p.955-61; full text; particularly, abstract; table III	1, 2-4, 6-13
X	SHARMA, R. et al., Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm.Res., 2001, Vol.18, No.10, p.1405-10	1, 2-4, 6, 7, 9, 12, 13
X	BARROW, E.L. et al., Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol.42, No.10, page 2682-9	1, 2-4, 6-9, 12, 13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 December, 2003 (08.12.03)		Date of mailing of the international search report 16 December, 2003 (16.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10871

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-186040 A (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 04 July, 2000 (04.07.00), Par. Nos. [0006], [0060] (Family: none)	2, 4-7
X	JP 11-116498 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 April, 1999 (27.04.99), Par. Nos. [0005], [0012] (Family: none)	3, 5-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/10871

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Invention group 1: claims 1, 2 and 4 and parts of claims 3 and 5 to 13.

Invention group 2: parts of claims 3 and 5 to 13.

Although the invention groups 1 and 2 are common to each other in relating to a remedy which induces the phagocytic activity of macrophages and acts on macrophages, a remedy inducing the phagocytic activity of macrophages and acting on macrophages had been publicly known at the point of the application of the present case, as described in the following document. Accordingly, there is no technical relationship between these invention groups 1 and 2 involving the same or corresponding special technical features and these groups of inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The invention group 1 relates to a remedy acting on macrophages and targeting diseases caused by a pathogen, while the invention group 2 relates to a remedy acting on macrophages and targeting diseases not caused by such a pathogen.

Such being the case, it is recognized that the claims of the present international application have 2 groups of inventions which do not relate to each other.

Document:

SHARMA, R. et al., Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm. Res., 2001, Vol.18, No.10, p.1405-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34,  
A61P1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02,  
35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D498/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/496, 9/14, 47/32, 47/34,  
A61P1/04, 29/00, 31/04, 31/06, 31/18, 33/02,  
35/00, 37/00, 37/04, 43/00, C07D498/08

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
日本国実用新案登録公報 1996-2003年  
日本国登録実用新案公報 1994-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)  
JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	O'HARA, P. et al, Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: manufacture and characterization, Pharm. Res., 2000, Vol. 17, No. 8, p. 955-61, 全文、特にAbstract、Table III等参照	1, 2-4, 6-13
X	SHARMA, R. et al, Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm. Res., 2001, Vol. 18, No. 10, p. 1405-10	1, 2-4, 6, 7, 9, 12, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保



4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BARROW, E. L. et al, Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol. 42, No. 10, p. 2682-9	1, 2-4, 6-9, 12, 13
X	JP 2000-186040 A (株式会社林原生物化学研究所) 2000. 07. 04 【0006】、【0060】段落等参照 (ファミリーなし)	2, 4-7
X	JP 11-116498 A (山之内製薬株式会社) 1999. 04. 27 【0005】、【0012】段落等参照 (ファミリーなし)	3, 5-7



## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (P C T 1 7 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

## 特別ページ参照

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 の続き

発明 1 : 請求の範囲 1, 2, 4、及び、請求の範囲 3, 5 - 1 3 の一部

発明 2 : 請求の範囲 3, 5 - 1 3 の一部

上記発明 1, 2 は、マクロファージの食食活性を誘起し、マクロファージに作用する治療薬である点で共通しているが、下記文献に記載の通り、マクロファージの食食活性を誘起し、マクロファージに作用する治療剤は本願出願時に公知であるので、上記発明 1, 2 の間に、同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がなく、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明とは認められない。

そして発明 1 は、病原体を原因とする疾患を対象とするマクロファージに作用する治療薬に係る発明であり、発明 2 は、そのような病原体を原因としない疾患を対象とするマクロファージに作用する治療薬に係る発明である。

したがって、本件国際出願の請求の範囲には、2 個の連関していない発明が含まれるものと認められる。

## 文献

- ・ SHARMA, R. et al, Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis, Pharm. Res., 2001, Vol.18, No.10, p.1405-10